

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Miloslava Chalupová**

Protektivní vliv ischemického perconditioningu na srdce  
Cardioprotective action of ischemic perconditioning

Bakalářská práce

Vedoucí práce:  
RNDr. Jan Neckář, Ph.D.

Praha, 2021

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci sepsala samostatně a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28.4. 2021

Podpis: .....

Miloslava Chalupová

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Janu Neckářovi, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, vstřícnost a čas, který mi věnoval při zpracování této bakalářské práce.

## **Abstrakt**

Remote ischemický preconditioning (RIPerC) se považuje za slibnou kardioprotektivní strategii, která je charakterizovaná jako krátké opakující se periody ischemie a reperfuze navozené během probíhajícího infarktu myokardu. Tato metoda poskytuje srdci efektivní ochranu před ischemicko-reperfuzním poškozením. Ačkoliv remote preconditioning snižuje rozsah nekrotické oblasti myokardu, mechanismy působení tohoto jevu nejsou stále zcela jasné. Tato bakalářská práce si proto klade za cíl shrnout dosavadní znalosti o RIPerC, jeho molekulárních mechanismech a protektivním vlivu na srdce.

**Klíčová slova:** srdce, ischemie, protekce, preconditioning

## **Abstract**

Remote ischemic preconditioning (RIPerC) is acknowledged to be a promising cardioprotective strategy, defined as brief repetitive periods of ischemia and reperfusion applied during ongoing myocardial infarction. This method provides protection against ischemia-reperfusion injury. Although remote preconditioning reduces infarct size, the underlying mechanisms remain unclear. The aim of this thesis is to summarize the current knowledge of RIPerC, its molecular mechanisms and protective effects on the heart.

**Key words:** heart, ischemia, protection, preconditioning

# Obsah

Úvod .....	1
1 Ischemická choroba srdeční .....	2
1.1 Ischemicko-reperfuzní poškození .....	2
2 Kardioprotektivní strategie tzv. conditioningem .....	3
2.1 Ischemický preconditioning .....	3
2.2 Ischemický postconditioning .....	4
2.3 Remote ischemický conditioning .....	4
3 Remote ischemický perconditioning .....	5
4 Molekulární mechanismy remote ischemického perconditioningu .....	6
4.1 Mitochondrie .....	7
4.1.1 $K_{ATP}$ kanály .....	7
4.1.2 Mitochondriální pór přechodné propustnosti (mPTP) .....	8
4.1.3 Apoptóza .....	8
4.2 RISK dráha .....	9
4.3 SAFE dráha .....	10
4.4 Metabolismus oxidu dusnatého .....	12
4.4.1 Oxid dusnatý .....	12
4.4.2 Argináza-NO dráha .....	12
4.5 Zánětlivá reakce .....	13
5 Komorbidity .....	15
5.1 Molekulární dráhy hyperglykemie .....	16
5.1.1 mTOR/AKT dráha .....	16
5.1.2 Oxidativní stres .....	16
5.1.3 Autofagie .....	17
5.1.4 RhoA/Rho kinázová (ROCK) signální dráha .....	18
Závěr .....	20
Seznam literatury .....	21

## Seznam použitých zkratek

AIM	Akutní infarkt myokardu
Akt	Proteinkináza B
ECM	Extracelulární matrix
eNOS	Endoteliální syntáza oxidu dusnatého
Erk	Erk kináza (z angl. extracellular signal-regulated kinase)
I/R poškození	Ischemicko-reperfúzní poškození
JAK	Janus kináza
LC3	Lehký řetězec s mikrotubuly asociovaného proteinu 3 (z angl. microtubule-associated protein light chain 3)
mPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti (z angl. mitochondrial permeability transition pore)
mTOR	Ser/Thr kináza (z angl. mammalian target of rapamycin)
NO	Oxid dusnatý
NRG-1	Neureglin-1
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
PKC	Proteinkináza C
PKG	Proteinkináza G
Rho	Ras homolog
RIC	Remote ischemický conditioning
RIPC	Remote ischemický preconditioning
RIPerC	Remote ischemický perconditioning
RIPostC	Remote ischemický postconditioning
RISK	Buněčná signální dráha RISK (z angl. risk salvage kinase)
RNS	Reaktivní formy dusíku (z angl. reactive nitrogen species)
ROCK	Rho-kináza (z angl. Rho-associated coiled-coil containing kinases)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)

SAFE	Buněčná signální dráha SAFE (z angl. survivor activating factor enhancement)
STAT	Signální transduktor a aktivátor transkripce
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor $\alpha$

## Úvod

Ischemická choroba srdeční patří v současnosti ve vyspělých státech světa k nejčastějším příčinám úmrtí. V důsledku onemocnění srdce a cév zemře ročně téměř 18 milionů lidí. Více jak 80% případů je přitom způsobeno akutním infarktem myokardu (AIM) či cévní mozkovou příhodou (World Health Organization, 2021).

V posledních letech se díky objevení nových léčebných metod a léků zvyšuje počet lidí, kteří AIM přežívají. Nicméně u mnoha z nich dochází po AIM k remodelaci tkáně a následnému rozvoji chronického srdečního selhání. Hlavním faktorem určujícím dlouhodobou prognózu pacientů po AIM je velikost odumřelé části srdeční svaloviny v důsledku ischemicko-reperfuze (I/R) poškození. Včasné obnovení průtoku krve do ischemické oblasti srdce je proto považováno za klíčové, tj. „zlatý standard“ v léčbě infarktu myokardu.

Je proto zřejmé, že jak klinický, tak experimentální výzkum se usilovně zabývá studiem nových kardioprotektivních metod, které snižují rozsah nekrotické oblasti srdce a představují tak nezbytný předpoklad pro zlepšení klinických výsledků léčby pacientů po AIM. Podle recentních experimentálních prací by za jednu z nejúčinnějších metod mohl být považován tzv. **remote ischemický conditioning** (RIC). Jedná se o krátké, opakující se periody ischemie/reperfuze aplikované na vzdálený orgán nebo tkáň, které poskytují srdci ochranu před akutním I/R poškozením. Jednou z variant RIC je také **remote ischemický preconditioning** (RIPerC), při němž mohou být cykly I/R (např. cykly I/R na končetině) prováděny během probíhající ischemie srdce. Ačkoliv se jedná o metodu, která má díky svému jednoduchému provedení největší potenciál pro využití v klinické praxi, mechanismy jejího působení nejsou stále zcela objasněny. Její přenesení do rutinní klinické praxe také komplikuje koincidence protektivních účinků RIPerC s různými komorbiditami (hypertenze, cukrovka a jiné), které se u pacientů s infarktem myokardu často vyskytují.

Tato práce si proto klade za cíl shrnout dosavadní poznatky o RIPerC a popsat jeho kardioprotektivní vliv na srdce. Zaměřuje se také na ovlivnění kardioprotektivního působení RIPerC některými komorbiditami, které jsou v současnosti největší limitací pro jeho uplatnění v klinické praxi.



# 1 Ischemická choroba srdeční

Ischemická choroba srdeční zahrnuje soubor onemocnění, které vznikají v důsledku sníženého průtoku krve koronárními tepnami nebo jejich úplným uzavřením. Pro správné fungování srdeční svaloviny je vyžadován neustálý přísun živin a kyslíku. Pokud je však cirkulace v koronárních arteriích výrazně redukována, nebo dokonce přerušena, dochází k nedokrvení srdečního svalu – ischemii myokardu. Ischemie způsobuje poruchy energetického metabolismu v kardiomyocytech, které vedou k buněčné smrti nekrózou či apoptózou. Příčinou uzavření koronárních arterií je téměř vždy ateroskleróza, tj. kornatění tepen. V současnosti patří ischemická choroba srdeční k nejčastějším onemocněním srdce a cév. Jejím akutním projevem je infarkt myokardu, který v srdci aktivuje proces patofyziologických změn charakterizovaných řadou srdečních abnormalit a strukturních defektů (IKEM, 2015).

## 1.1 Ischemicko-reperfuzní poškození

Zásadní problém v patofyziologii ischemické choroby srdeční představuje poškození myokardu, které vzniká následkem nedostatečného zásobení tkáně kyslíkem. Pokud ischemická perioda trvá delší dobu, dochází k nevratnému poškození kardiomyocytů, které nakonec podléhají buněčné smrti. Jedinou možností, jak ischemický myokard ochránit před důsledky AIM je rychlá obnova krevního zásobení, tj. včasná reperfuze. Nicméně reperfuze sama o sobě také přispívá k dalšímu poškození tkáně a zhoršuje srdeční dysfunkci. Výsledná velikost nekrotické oblasti srdce tedy závisí na obou faktorech, době trvání ischemie a včasné reperfuzi, a je výsledkem celkového I/R poškození (Kleinbongard et al., 2017).

Mechanismy, které se účastní v patogenezi I/R poškození jsou velmi komplexní, vysoce integrované a multifaktoriální. Vlivem nedostatku kyslíku během ischemie dochází v myokardu ke změně buněčného metabolismu z aerobního na anaerobní, což způsobuje nahromadění laktátu, vyčerpání ATP a snížení pH. Dále se také zvyšuje intracelulární koncentrace  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  a inhibuje se kontraktilní funkce myokardu. Během reperfuze je znovu aktivován elektron-transportní řetězec, což vede ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS). ROS dále mohou ovlivnit rozsah reperfuzního poškození tím, že zvyšují pravděpodobnost otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti (mPTP), jenž spouští kaskádu intracelulární signalizace vedoucí k apoptóze či nekróze. Kromě toho v reakci na vysoké množství ROS dochází také k akumulaci neutrofilů a vzniku zánětlivé odpovědi (Hausenloy and Yellon 2013).

## 2 Kardioprotektivní strategie tzv. conditioningem

Výsledná velikost ischemické oblasti myokardu ovlivňuje funkčnost a remodelaci srdce po AIM a je hlavním parametrem, který určuje dlouhodobou prognózu pacientů s prodělaným infarktem myokardu (Lonborg et al., 2013). Poté, co bylo experimentálně potvrzeno, že v ischemické toleranci srdce hraje důležitou roli také včasná reperfuze (Ginks et al., 1972; Maroko et al., 1972), došlo k rozvoji několika kardioprotektivních strategií, které mají za cíl ochránit myokard před I/R poškozením a snížit tak velikost infarktu. Nejúčinnější kardioprotekci poskytuje v současnosti aplikování krátkých period I/R, tedy tzv. ischemický conditioning, kterému jsou věnovány následující kapitoly.

### 2.1 Ischemický preconditioning

Základní paradigma těchto kardioprotektivních metod představuje ischemický preconditioning. Jeho podstatou je navození krátkých period ischemie srdce (v jednotkách minut), následovaných periodami reperfuze, které jsou opakovány v cyklech před začátkem dlouhodobé okluze koronární tepny. Tyto periody paradoxně nezpůsobují ireverzibilní poškození myokardu, naopak ho činí více rezistentní vůči následnému dlouhotrvajícímu ischemickému inzultu a reperfuzi.

Fenomén ischemického preconditioningu jako první prokázali Murry et al. (1986) u psů. Ochranný vliv na ischemický myokard však pozorovali pouze v situaci, kdy byly periody I/R navozeny před 40 minutovou okluzí koronární tepny. Pokud okluze koronární arterie trvala 3 hodiny, ke snížení rozsahu poškozené oblasti myokardu nedošlo, což jen zdůrazňuje nutnou potřebu včasné reperfuze.

Kardioprotektivní účinek ischemického preconditioningu je dvoufázový a vede ke vzniku dvou časově oddělených období ochrany. Časná fáze, tzv. první okno protekce, nastupuje bezprostředně, v řádech minut, po ukončení posledního cyklu ischemického preconditioningu a trvá přibližně 2-4 hodiny. První okno závisí na aktuální dostupnosti kardioprotektivních signálních proteinů a molekul. Byly podány důkazy o tom, že tato časná fáze je zprostředkována aktivací proteinkináz C (PKC), kinázami aktivovanými mitogeny (MAPK), ROS, nebo draslíkovými na ATP závislými ( $K_{ATP}$ ) kanály (Loubani & Galiñanes, 2002). Během 12–24 hodin od původního stimulu nastupuje druhá fáze protekce, která představuje genomickou a proteomickou odpověď na prvotní stimul. Ta obvykle přetrvává maximálně 3–4 dny (Loubani et al., 2004). Toto tzv. druhé okno protekce je charakterizované potlačením exprese zánětlivých genů a syntézou nových proteinů, jež mohou významně ovlivnit výslednou ischemickou toleranci srdce (Konstantinov et al., 2005).

Přestože ischemický preconditioning představoval v posledních 30 letech široce studovaný fenomén, jeho využití je v klinické praxi limitované. Kvůli nutnému invazivnímu přístupu k cílovému orgánu může být prováděn pouze při vybraných operačních zákrocích, mezi které patří například perkutánní koronární intervence a koronární bypass, ve kterých je začátek ischemie dobře znám (Teoh et al., 2002). Pro nepředvídatelné klinické stavy, jakými jsou akutní infarkt myokardu či cévní mozková příhoda, bylo nutné přijít s jinými, více klinicky relevantními metodami a technikami.

## **2.2 Ischemický postconditioning**

Nevýhody spojené s včasnou aktivací ischemického preconditioningu pomohlo překonat objevení tzv. ischemického postconditioningu, kdy jsou periody I/R aplikovány až na začátku reperfuze. Tento protektivní jev poprvé popsali Zhao et al. (2003), kteří zjistili, že ischemický postconditioning je v případě snížení I/R poškození a redukce endoteliální dysfunkce téměř stejně účinný jako preconditioning. Ačkoliv nebyl definován žádný optimální protokol, ischemický postconditioning musí být navozen co nejdříve, během prvních sekund či minut reperfuze.

Postconditioning lze úspěšně přenést i na léčbu pacientů s kardiovaskulárními onemocněními. Kladných výsledků bylo dosaženo například při jeho realizaci po mechanickém obnovení krevního toku u pacientů s AIM (Garcia et al., 2011). Z klinického hlediska však stále přetrvává nevýhoda v prodloužení operační doby přibližně o 15-20 minut. Další negativní stránkou obou těchto invazivních metod (srdečního lokálního pre- i post- conditioningu) navíc je, že v přítomnosti aterosklerózy mohou vést k závažným komplikacím, například k prasknutí aterosklerotického plátu (Szijártó et al., 2012).

## **2.3 Remote ischemický conditioning**

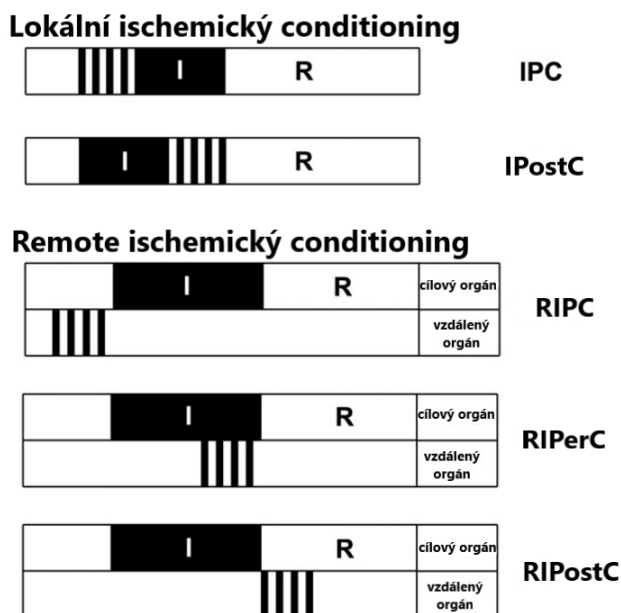
Stěžejním krokem pro možné využití kardioprotektivních strategií v klinické praxi bylo objevení RIC. Zjistilo se, že krátké opakující se periody ischemie a reperfuze nemusí být prováděny pouze lokálně na srdci, ale lze je realizovat také na dálku. Primární výzkum provedli Przyklenk et al. (1993), kteří prokázali ochranný efekt tzv. remote preconditioningu (RIPC) věnčité tepny na vzdálenou oblast srdce, poškozenou dlouhodobou okluzí jiné koronární tepny. Dnes se zdá být RIC efektivní strategií, kterou lze uplatnit nejen pro ochranu srdce, ale i dalších orgánů jako jsou játra, ledviny, plíce či mozek (Hougaard et al., 2014; Zarbock et al., 2015). V průběhu let se také ukázalo, že se jedná o systémovou odpověď organismu, která může být vyvolána různými stimuly a je efektivní u všech dosud testovaných živočišných druhů, člověka

nevyjímaje. Podle načasování lze RIC rozdělit nejen na pre- či post-, ale také na perconditioning, při němž je kardioprotektivní stimul aktivován během probíhající ischemie srdce.

### 3 Remote ischemický perconditioning

Koncept RPerC jako první prokázali Schmidt et al. (2007). U prasečích modelů demonstrovali, že krátké I/R periody prováděné na zadní končetině během srdeční ischemie snižují rozsah I/R poškození myokardu, zachovávají postischemickou systolickou a diastolickou funkci srdce a chrání myokard před reperfuzními arytmiemi.

Ze všech výše zmíněných fenoménů RIC má právě RPerC největší potenciál pro využití v lékařské praxi. Jeho hlavní výhoda spočívá především ve snadné realizaci. Lze ho provádět bez speciálních zdravotnických prostředků i odborných znalostí, díky čemuž byl také úspěšně prokázán při výzkumu kardioprotekce u lidí s AIM. Jeho protektivní působení se potvrdilo například při operacích srdečních chlopní. U pacientů došlo k výraznému snížení hladiny troponinu I, jako hlavního markeru poškození srdce, který prokazuje i mikroskopické zóny nekrotického myokardu (Li et al., 2010). Za asi nejvýznamnější úspěch je považována studie, ve které byl pacientům s AIM navozen RPerC na horní končetině, pomocí inflace a deflace manžety na měření tlaku, v průběhu jejich převozu do nemocnice (Bøtger et al., 2010). Výsledky této studie potvrdily ochranný účinek RPerC, který vedl k menšímu poškození srdce v důsledku rozvíjejícího se AIM.



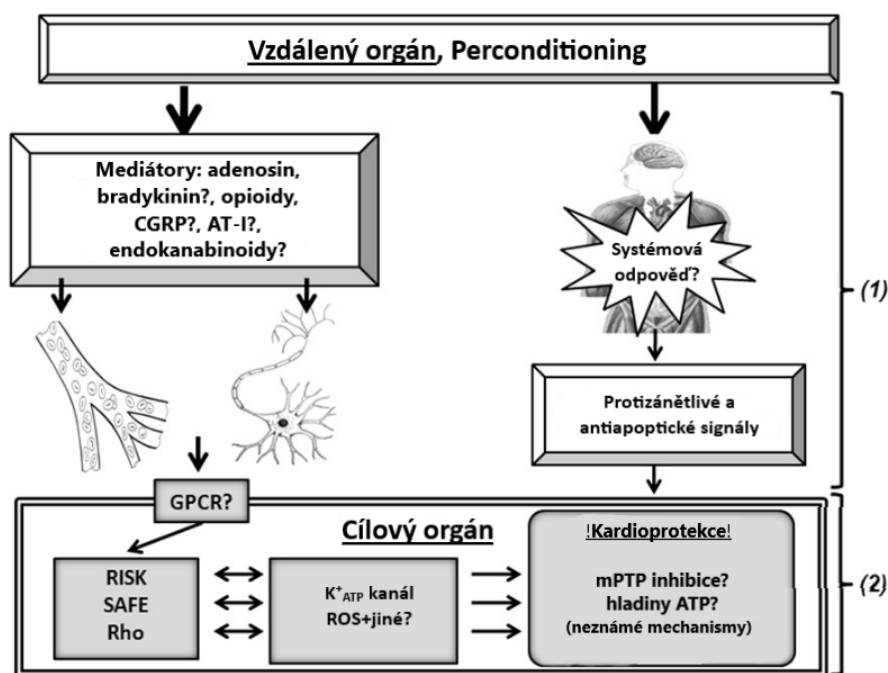
Obr. 1: Grafické shrnutí možných kardioprotektivních strategií aktivovaných různými protokoly conditioningu. Černé pruhy = ischemie. Bílé pruhy = reperfuze. IPC (ischemický preconditioning), IPostC (ischemický postconditioning), RIPC (remote ischemický preconditioning), RPerC (remote ischemický perconditioning), RPostC (remote ischemický postconditioning). Převzato z Szijártó et al., 2012

## 4 Molekulární mechanismy remote ischemického preconditioningu

Přestože se podařilo protektivní vliv RPerC převést i do klinické praxe, podstata jeho molekulárních mechanismů zůstává stále z větší části nejasná. Pro jejich objasnění lze hledat inspiraci u příbuzných forem conditioningu. Co se týká molekulárních mechanismů, lépe prozkoumaným je RIPC, u kterého se při přenosu signálu ze vzdáleného místa k cílovému orgánu předpokládá úloha vzájemné interakce 3 mechanismů – humorálního, neuronálního a systémového. Jednotlivé typy conditioningu se však liší svým časovým provedením, což vede k úvahám o rozdílné aktivaci a koncentraci jednotlivých faktorů signálních drah. Klíčové složky všech typů RIC však s největší pravděpodobností zůstávají stejné (Szijártó et al., 2012).

V současnosti existuje řada studií ukazujících na mnoho odlišných signálních molekul a mechanismů, které se mohou při remote conditioningu uplatňovat. Výzkumy navíc probíhají na různých úrovních, od izolovaných buněčných organel (např. mitochondrie) přes kardiomyocyty a izolovaná srdce, až po celé zvíře. Objasnění dané problematiky také komplikuje využívání odlišných modelových organismů, či různých imunologických a biochemických metod (Heusch et al., 2015).

Na základě obecných znalostí o RIC lze usuzovat, že v protektivním mechanismu RPerC budou existovat dvě hlavní cesty kardioprotekce. První poskytuje spojení mezi vzdáleným a cílovým orgánem a zahrnuje již dříve zmíněné mechanismy humorální, neuronální a systémové. Druhou část tvoří signální transdukce a efektorové mechanismy, kam patří především molekulární a subcelulární složky, a také složky spojené s kanály – viz obr. 2 (Szijártó et al., 2012). Nejvíce diskutované molekulární mechanismy spojené s RPerC jsou detailněji probrány v následujících kapitolách.



Obr. 2: Základní molekulární mechanismy RPerC. 1) Spojovací mechanismy mezi vzdáleným a cílovým orgánem. 2) Efektorové složky a složky signální transdukce. Převzato z Szijártó et al., 2012

## 4.1 Mitochondrie

Ačkoliv u RPerC není stále přesně jasné, jak kardioprotektivní signalizace probíhá od vzdáleného orgánu k srdci, intracelulární signalizace se zdá být u všech typů conditioningů podobná. Za nejdůležitější cílový efektor v ochraně myokardu jsou považovány mitochondrie, které ovlivňují kardioprotekci prostřednictvím různých procesů spojených například se zvýšenou produkcí ROS, otevřením mPTP nebo  $K_{ATP}$  kanálů, či s apoptózou (Klembongard et al., 2017).

### 4.1.1 $K_{ATP}$ kanály

$K_{ATP}$  kanály jsou dovnitř usměrňující kanály, které se v kardiomyocytech hojně vyskytují především na vnitřní membráně mitochondrií a na sarkolemě. Jsou aktivovány intracelulárním ATP a inhibovány intracelulárními nukleosid difosfáty, čímž poskytují propojení mezi buněčným metabolismem a membránovou excitabilitou (Fujita & Kurachi, 2000). Především mitochondriální  $K_{ATP}$  kanály hrají důležitou roli v regulaci odolnosti srdce k I/R poškození. Jejich působení bylo potvrzeno u všech existujících forem conditioningu (Fryer et al., 2001; Loukogeorgakis et al., 2007), včetně RPerC, což demonstrovali Schmidt et al. (2007). Podáním specifického blokátoru  $K_{ATP}$  kanálů glibencalmidu inhibovali protektivní účinek RPerC u prasat. Stejného výsledku dosáhli i Zhao et al. (2009) při studiích na potkanech. Ti navíc ukázali, že otevření  $K_{ATP}$  kanálů závisí také na inhibici Rho-kinázy.

Dále mohou otevírání mitochondriálních  $K_{ATP}$  kanálů mimo jiné ovlivňovat oxid dusnatý (NO) (Sasaki et al., 2000), či PKC (Sato et al., 1998) a PKG (Costa et al., 2005). Po otevření kanálů začnou mitochondrie produkovat více ROS, které mohou pozitivní zpětnou vazbou opět aktivovat PKC (Costa & Garlid, 2008). Jedná se o ambivalentní roli ROS. Stejně tak, jako ischemie, která je prováděna v krátkých intervalech může být prospěšná, tak i krátkodobě zvýšená produkce ROS v malém množství může svou signalizací přispívat k ochraně myokardu.

#### **4.1.2 Mitochondriální pór přechodné propustnosti (mPTP)**

Mitochondriální pór přechodné propustnosti (mPTP) se nachází na vnitřní mitochondriální membráně a jeho otevření při reperfuzi je považováno za konečný efektor vedoucí k buněčné smrti apoptózou a nekrózou (Lejay et al., 2016). Za fyziologických podmínek je mPTP převážně v zavřeném stavu. Během reperfuze však dochází k jejich otevření v odpovědi na zvýšenou intracelulární hladinu vápenatých iontů a vyšší produkci ROS. Výsledkem je narušení mitochondriálního transmembránového potenciálu, uvolnění cytochromu c, spuštění cytosolické kaskády kaspáz a vyčerpání ATP. Inhibice otevření mPTP je součástí kardioprotekce pomocí RIPC a může být vyvolána aktivací RISK dráhy (Hausenloy et al., 2004). V souvislosti s RIPC se také uvažuje o účasti mPTP v mechanismu protekce. Pravděpodobně k jeho inhibici dochází přes zvýšenou produkci ROS mitochondriemi v důsledku otevření  $K_{ATP}$  kanálů (Zhang et al., 2018).

#### **4.1.3 Apoptóza**

Jedním z typů buněčné smrti kardiomyocytů v důsledku I/R poškození je apoptóza. Podstoupení buněčné smrti může být reakcí na mnoho různých stimulů, včetně hypoxie, oxidačního stresu či metabolické inhibice. Apoptóza představuje programovanou buněčnou smrt. Jedná se o děj závislý na ATP, který zahrnuje uvolnění cytochromu c z poškozených mitochondrií, či aktivaci ligandů některých membránových receptorů. V důsledku aktivace kaspáz a jiných signálních molekul dochází nakonec ke vzniku neselektivních pórů v mitochondrii, štěpení DNA a degradaci jader (Rossello & Yellon, 2018).

Intracelulární myocytární apoptotická dráha je řízena rodinou Bcl-2 proteinů, které modulují propustnost mitochondriální membrány. Bcl-2 rodina může být rozdělena na proapoptotické a antiapoptotické proteiny. Antiapoptotické proteiny Bcl-2 podporují přežívání buněk potlačením funkce proapoptotického Bcl-2 proteinu Bax, který řídí uvolnění cytochromu c z mitochondrií a iniciuje aktivaci kaspáz (Pastorino et al., 1998). Role Bcl-2 v přežívání buněk byla potvrzena i během výzkumu preconditioningu, kdy došlo k jejich zvýšené expresi (Maulik

et al., 1999). Během ischemie byla navíc v srdečních buňkách prokázána zvýšená aktivita Bax (Capano & Crompton, 2006).

Zvýšená exprese Bcl-2 byla pozorována i během RPerC při pokusech na potkanech. Zhu et al. (2013) pozorovali zvýšené hladiny Bcl-2 u všech typů RIC, zatímco exprese Bax u těchto tří strategií, RIPC, RPostC i RPerC, byla nižší. Stejného výsledku během RPerC dosáhli i Wang et al. (2016). Tito autoři také zkoumali hypotézu, že ischemií a morfinem vyvolaná kardioprotekce sdílí podobné signální antiapoptotické dráhy. To se podařilo potvrdit zvýšením poměru Bcl-2/Bax, a naopak snížením počtu apoptotických buněk v ischemické oblasti srdce během navození obou kardioprotektivních strategií. Ochranný efekt vyvolaný kombinací těchto metod se zdál být účinnější, než samostatně aktivovaná protekce RPerC nebo morfinem.

## 4.2 RISK dráha

Během reperfuze se v myokardu aktivují specifické kinázy, které mohou zprostředkovat buněčnou signalizaci pro přežití buněk a poskytují adekvátní kardioprotektivní odpověď vůči I/R poškození. Podle těchto kináz byla pojmenovaná celá dráha, tzv. RISK (reperfusion injury salvage kinase) (Schulman et al., 2002). Je považována za univerzální buněčnou signální kaskádu, neboť kromě conditioningu se může aktivovat také pomocí farmakologických látek, jakými jsou například adenosin, bradykinin či statiny (Rossello & Yellon, 2018).

Aktivace RISK dráhy během reperfuze a její pozitivní účinky na ischemický myokard byly potvrzeny jak u ischemického preconditioningu (Hausenloy et al., 2005), tak i postconditioningu (Tsang et al., 2004). U ischemického preconditioningu se podařilo definovat detailní mechanismy a popsat celý řetězec kináz sestávající z Akt-eNOS-cGMP-PKG dráhy, který vede k otevření mitochondriálních  $K_{ATP}$  kanálů vedoucí ke zvýšené produkci ROS a další aktivaci kináz (Samavati et al., 2002). V případě RPerC se zdá být aktivace RISK dráhy dosud spíše kontroverzní. Xin et al. (2010) potvrdili, že u potkanů, kteří podstoupili RPerC, se určité složky RISK kaskády aktivují. U této skupiny potkanů autoři zaznamenali zvýšenou hladinu fosforylace Akt a Erk 1/2 kináz v porovnání s kontrolními jedinci. Jejich výsledky se shodovaly i s dalšími pokusy prováděnými na potkanech (Tamareille et al., 2011). Naopak při studiích na prasečích modelech působení RISK dráhy potvrzeno nebylo (Hausenloy et al., 2012; Skyschally et al., 2018). RPerC si v těchto případech zachoval svůj kardioprotektivní účinek i po podání specifického inhibitoru RISK signální dráhy.

Hlavní příčinou odlišných výsledků by mohla být druhová specifita aktivace RISK dráhy. Skyschally et al. (2018) proto zkoumali, zda bude protektivní efekt RPerC zachován po



odebrání krevní plazmy z prasat, u kterých byl navozen RPerC a jejím přenosu do izolovaných srdcí potkanů a myší. U hlodavčích srdcí perfundovaných dialyzátem plazmy z prasečího modelu bylo pozorováno snížení velikosti infarktu. Navíc, po inhibici RISK dráhy, byl tento protektivní efekt inhibován. Podle všeho se tedy zdá, že signální dráhy u všech typů conditioningu jsou do značné míry stejné, ačkoliv se mohou v určitých detailech lišit mezi jednotlivými živočišnými druhy (Skyschally et al., 2018).

### 4.3 SAFE dráha

Mezi další intracelulární mechanismy, které mohou být zahrnuty v kardioprotekci zprostředkované RPerC patří také SAFE (survivor activating factor enhancement) dráha. Je aktivována imunitním systémem a řídí funkci několika komponent důležitých pro přežití buněk. Klíčové složky představují cytokin tumor nekrotizující faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a signální transduktor a aktivátor transkripce-3 (STAT-3). STAT-3 je transkripční faktor, ale v odpovědi na conditioning se častěji než při transkripci uplatňuje při fosforylaci některých složek intracelulární signalizace, jako například při fosforylaci a inaktivaci proapoptotického faktoru Bad (Lecour et al., 2005). SAFE dráha poskytuje ochranu při ischemickém preconditioningu (Gent et al., 2017) i postconditioningu (Heusch et al., 2011), a podobně jako RISK dráha inhibuje otevírání mPTP (Boengler et al., 2010).

Na začátku SAFE signalizace stojí Janus kináza (JAK)/STAT dráha, která je v srdci stimulovaná během I/R (Negoro et al., 2000). JAK kináza aktivovaná TNF- $\alpha$  dále aktivuje STAT-3 protein, který ovlivněním mitochondriální funkce (potlačení otevírání mPTP, snížení tvorby ROS) zprostředkovává ochrannou odpověď (Wegrzyn et al., 2009). Ačkoliv zvýšená hladina TNF- $\alpha$  může přispívat během reperfuze k srdeční dysfunkci a apoptóze a rozvoji chronického srdečního selhání (Maekawa et al., 2002), jeho stimulace v srdci v časně ischemii nebo reperfuzi je paradoxně spojována s ochranným účinkem ischemického conditioningu (Lacerda et al., 2009). U myší, které měly gen pro TNF- $\alpha$  inaktivovaný nebylo možné protektivní vliv conditioningu aktivovat (Smith et al., 2002).

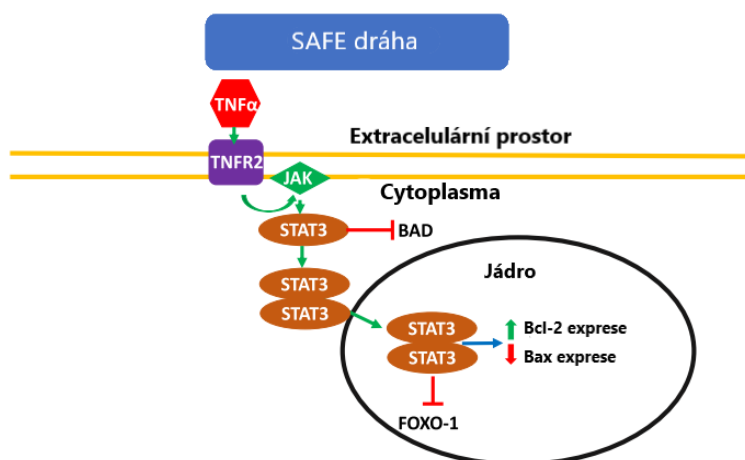
Dále může být SAFE dráha navozena také vazbou TNF- $\alpha$  na svůj TNF receptor 2, čímž se aktivuje STAT-3, který může inhibovat apoptotický faktor FOXO-1 v jádře (viz obr. 3). Protein STAT-3 může také zvyšovat genovou expresi antiapoptotického proteinu Bcl-2 a naopak snižovat expresi proapoptotického proteinu Bax (Hattori et al., 2001).

Zajímavé je, že kardioprotekce remote ischemického conditioningu u pacientů, kteří podstoupili koronární bypass, je spojena pouze s aktivací STAT-5 a nikoliv se STAT-3 (Heusch et al., 2012). U výzkumů RPerC se výsledky mezi různými druhy v aktivaci STAT proteinů

liší a přesný mechanismus působení SAFE dráhy není zatím zcela objasněn. Zvýšená fosforylace STAT-3 během reperfuze byla v souvislosti s RPerC pozorována především u prasečích modelů (Kleinbongard et al., 2018a). Snížení rozsahu infarktu se navíc prokázalo viditelným poklesem elevace ST segmentu. Na stejném, zavedeném modelu I/R u prasat potvrdili zvýšenou aktivitu STAT-3 i Skyschally et al. (2018), v obou případech byl kardioprotektivní účinek inhibován podáním blokátoru STAT-3. V prvním případě však zaznamenali zvýšenou fosforylaci ve 120. minutě reperfuze, avšak v druhém pokusu v 10. minutě. Obecně lze tedy říci, že aktivace a načasování zvýšení STAT-3 není tak fixní jako jeho inhibice (Kleinbongard, et al., 2018b).

Aktivace STAT-3 byla u prasat potvrzena u všech typů conditioningu. Rozdílných výsledků však dosahují výzkumy prováděné na jiných zvířecích modelech. Andreadou et al. (2015) ve své studii na králících nezjistili žádné zvýšené hodnoty STAT-3 fosforylace během RPerC. Během reperfuze však pozorovali aktivaci STAT-5. Inhibitor signální dráhy zahrnující STAT-5 protein však kardioprotektivní efekt RPerC neovlivnil, což vedlo k závěrům, že u králíků se STAT-5 během kardioprotekce zprostředkované RPerC sice aktivuje, ale samotný není pro ochranu přímo vyžadován.

U potkanů se výrazné zvýšení fosforylace STAT proteinu během RPerC také nepotvrdila, nicméně i přesto dokázal RPerC poskytnout myokardu ochranu (Tamarelle et al., 2011). Pokud však byl RPerC zkombinován s IPostC, tak se hladiny STAT-3 výrazně zvýšily, což se projevilo i na vyšší redukci velikosti infarktu myokardu. Kromě SAFE dráhy však tato skupina pozorovala i změny exprese proteinů RISK dráhy. Je tedy pravděpodobné, že při aktivaci kombinace obou kardioprotektivních metod, RPerC i IPostC, dochází ke zkřížené interakci obou protektivních signálních drah, RISK i SAFE (Tamarelle et al., 2011).



Obr. 3: Schématické znázornění průběhu SAFE signální dráhy. Převzato z: Rosenberg et al., 2018

## 4.4 Metabolismus oxidu dusnatého

### 4.4.1 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je důležitou buněčnou signální molekulou, která se v organismu účastní mnoha dějů, které jsou nezbytné pro zachování integrity a správné funkce kardiovaskulárního systému, zvláště pak cév (Chandra et al., 2012). NO produkovaný endoteliálními buňkami působí jako vasodilatátor (Hein et al., 2003), inhibuje apoptózu (Li et al., 1999), zabraňuje neutrofilům adherovat na povrch endotelu cév (Ma et al., 1993), a také může působit jako antioxidant, který vychytává ROS (McCall et al., 1989). Je dobře známé, že snížené hladiny NO přispívají k dysfunkci cévního endotelu a rozvíjí I/R poškození kardiovaskulárních chorob, včetně poškození, která jsou spojena s infarktem myokardu a vaskulárními komplikacemi u diabetiků (Tratsiakovich et al., 2017).

Jednou z hlavních drah, prostřednictvím které může NO ovlivňovat ischemickou toleranci srdce, je signalizace zprostředkovaná receptory spáženými s G proteiny. Ty mohou být aktivované pomocí bradykininu, adenosinu, opioidů a dalších látek (Tratsiakovich et al., 2013). Následně se aktivuje endoteliální NO syntáza (eNOS), která produkuje NO. NO se dále může vázat na guanylátcyklázu a aktivuje PKG a PKC, což vede k otevření  $K_{ATP}$  kanálů (Heusch et al., 2008). Tato dráha je aktivována především při ischemickém preconditioningu a postconditioningu. Nicméně celkem nedávná studie Zhang et al. (2018) ukazuje, že aktivace opioidních receptorů a NO-PKC- $K_{ATP}$  signalizace je zahrnuta také v kardioprotekci vyvolané RPerC.

### 4.4.2 Argináza-NO dráha

Další metabolickou dráhou, která je v současnosti často probírána ve spojitosti s RPerC je na argináze závislá disociace L-argininu na L-ornithin a močovinu (Kiss et al., 2014). Právě argináza, enzym močovinového cyklu, je limitujícím faktorem pro tvorbu NO (White et al., 2006). Nachází se ve dvou izoformách a obě jsou široce zastoupeny v kardiovaskulárním systému. V myokardu a v koronárních tepnách se zvyšuje její exprese během ischemie (Gonon et al., 2012; Hein et al., 2003). Stejně tak je její aktivita zvýšená i v dalších kardiovaskulárních patologických situacích často spojených se stárnutím. Příkladem může být ateroskleróza, hypertenze, či diabetes mellitus (Ming et al., 2004; Romero et al., 2008). V takových případech dochází ke kompetici arginázy s eNOS o jejich společný substrát L-arginin, čímž se snižuje dostupnost NO. Následkem toho dochází ke zvýšené produkci superoxidu ( $O_2^-$ ), která je zprostředkovaná mechanismem nazývaným rozpřažení NO syntázy.  $O_2^-$  reaguje s NO za vzniku peroxynitritu ( $ONOO^-$ ), a dále redukuje množství biologické dostupnosti NO (Chandra et al.,

2012). Reaktivní formy kyslíku, které jsou důležitým hráčem při rozvoji I/R poškození, mohou navíc také přispívat ke zvyšování arginázové aktivity tím, že aktivují RhoA/ROCK signální dráhu. Zapojení této dráhy bylo především zkoumáno v souvislosti s rozvojem cukrovky, proto bude detailněji tato signalizace vysvětlena v kapitole o limitacích kardioprotektivního působení RPerC při komorbiditách (viz kapitola 5).

#### **4.5 Zánětlivá reakce**

U mnoha pacientů, kteří přežijí AIM dochází k remodelaci levé komory, jež vede k fibrotizaci tkáně a následné srdeční dysfunkci. Patofyziologické strukturální změny komory úzce souvisí s nadměrným rozvojem zánětlivé reakce, která je iniciována sérií komplexních buněčných dějů. Na druhou stranu má však zánět i svou důležitou funkci v opravě srdeční tkáně. Nejdříve dochází k časně fázi zánětlivé reakce, kdy je poškozené místo zbaveno mrtvých buněk a zbytků extracelulární matrix (ECM). Po ní následuje fáze reparační, charakterizovaná odstraněním zánětu a vznikem jizvy.

Na zánětlivou reakci, která se uplatňuje při strukturální přeměně levé komory po infarktu může svým protektivním vlivem působit jak cílový, tak vzdálený ischemický conditioning. Bylo zjištěno, že během aplikace krátkých period I/R dochází ke změně profilu genetické exprese celého organismu protizánětlivým a antiapoptotickým směrem (Souza Filho et al., 2009; Szijártó et al., 2012). Inhibice sekrece prozánětlivých cytokinů vede ke snížené schopnosti neutrofilů adherovat na endotel cév a pronikat do tkání, což má za následek potlačení průběhu lokálního zánětu (Shimizu et al., 2010). Navíc redukce infiltrace leukocytů způsobuje menší produkci ROS, jejichž vznik je typický pro pozdní fázi reperfuze.

Pozitivní vliv RIC na nežádoucí remodelaci levé komory po infarktu myokardu potvrdili Wei et al. (2011). Ve své studii prokázali, že oba typy conditioningu, RPerC i RPostC, se podílí na snížení zánětlivé reakce v myokardu potkanů. Čtvrtý den po navození infarktu myokardu pozorovali sníženou infiltraci makrofágů a monocytů do ischemií postižené oblasti srdce, sníženou expresi IL-1 $\beta$  a redukci oxidativního stresu v důsledku kardioprotektivních intervencí.

Vliv RPerC na průběh zánětlivé reakce u potkanů zkoumali také Pilz et al. (2019). Jejich stěžejním zjištěním bylo, že RPerC je spojen se zvýšenou hladinou proteinu Neureglinu-1 (NRG-1) a expresí jeho receptoru ErbB3. NRG-1 je růstový faktor, který má antiremodelační a protizánětlivé účinky (Galindo et al., 2014) a spolu se svými receptory z rodiny ErbB3 ovlivňuje regulaci kardiovaskulárního vývoje a udržuje funkční a strukturální integritu srdce dospělých jedinců (Hedhli et al., 2011). Utlumení jeho aktivity během infarktu má za následek

expanzi zánětlivé reakce. Naopak zvýšení NRG-1 při RPerC může přispívat k lepší srdeční funkci (Pilz et al., 2019). Navíc signální dráha NRG-1/ErbB3 inhibuje přeměnu srdečních fibroblastů na myofibroblasty, tedy buňky zodpovídající za proces ukládání kolagenu, což je charakteristický děj pro fibrotizaci tkáně po infarktu myokardu.

Dále také Pilz et al. (2019) pozorovali výrazné snížení exprese hladiny Tenascin-C (TNC) v důsledku RPerC. Protein TNC se v srdci zdravých jedinců téměř nevyskytuje, je však silně exprimován během srdečních onemocnění spojených se zánětem. Ovlivňuje také imunitní reakci tím, že moduluje polarizaci M1/M2 makrofágů (Kimura et al., 2018). Podporuje vznik M1 makrofágů, které produkují prozánětlivé cytokiny, chemokiny a růstové faktory. Naopak druhou skupinu, M2 makrofágy, inhibuje. Ty zodpovídají za opravy tkáně a odstranění zánětu. Celkově lze tedy říci, že RPerC pozitivně ovlivnil srdeční funkce po AIM tím, že snížil škodlivou remodelaci srdce po infarktu a utlumil zánětlivou reakci.

## 5 Komorbidity

Experimentální modely, které jsou využívány v kardiovaskulárním výzkumu ne vždy odpovídají klinické situaci. Ve většině případů je kardioprotektivní působení ischemického conditioningu popisováno na zdravých jedincích a jeho přenesení do klinické praxe nelze proto považovat za samozřejmost. Ve skutečnosti právě další onemocnění, která se vyskytují u pacientů s AIM (např. diabetes mellitus, hypertenze, hyperlipidémie aj.) celou situaci komplikují. Také při léčbě těchto onemocnění pomocí různých farmakoterapií, jako jsou statiny, nitráty či perorální antidiabetika, dochází k omezení či úplnému zrušení kardioprotektivního vlivu RIC (Baranyai et al., 2015).

Především diabetes mellitus představuje významnou výzvu pro zavedení RIC do klinické praxe. Jeho negativní vliv na srdce byl popsán u všech typů RIC, včetně RPerC. Kiss et al. (2014) navodili diabetes I. typu pomocí intravenózní injekce streptozocinu a demonstrovali, že RPerC sice výrazně snížil myokardiální oblast infarktu u nediabetických potkanů, ale již nedokázal ovlivnit infarkt u potkanů s diabetem I. typu.

Hyperglykemie u pacientů se kromě chronických metabolických chorob, může také objevovat i v akutních stavech, jako například při akutním koronárním syndromu (Baranyai et al., 2015). Při výzkumu na potkanech, kterým byla akutní hyperglykemie navozena podáním infuze 50% dextrózy, došlo k výraznému utlumení protektivního účinku RPerC. Naproti tomu u skupiny normoglykemických zvířat, která obdržela 46% manitol pro udržení podobné osmolarity, se snížení infarktu v důsledku RPerC potvrdilo (Baranyai et al., 2015). Autoři dále publikovali, že hyperglykemie u potkanů zvyšuje incidenci a dobu trvání ischemických arytmií v porovnání se zvířaty s normálními hodnotami glykemie, avšak sama o sobě neovlivňuje rozsah I/R poškození. Stejného výsledku dosáhly i některé další studie (Kersten et al., 2001; Raphael et al., 2010). Několik jiných studií je však s tímto zjištěním v rozporu (Mapanga et al., 2014; Su et al., 2013). Ty naopak ukázaly, že akutní hyperglykemie ke zhoršenému rozsahu infarktu myokardu přispívá. Tyto rozporuplné výsledky mohly vzniknout v důsledku podání odlišných koncentrací glukózy. K potvrzení zvýšení infarktu myokardu při akutní hyperglykemii došlo ve studiích, které podávaly experimentálním modelům výrazně vyšší koncentraci glukózy (více než 30mM). Baranyai et al. (2015), kteří nepozorovali žádné ovlivnění akutní hyperglykemií, použili naopak koncentraci výrazně nižší (15-20mM).

## 5.1 Molekulární dráhy hyperglykemie

U každého typu conditioningu se během diabetu či akutní hyperglykemie uvažuje o aktivaci odlišných signálních drah. Mezi molekulární dráhy, které jsou nejvíce diskutované v souvislosti s utlumením protektivního vlivu RPerC u diabetických modelů, patří například ovlivnění mTOR/AKT dráhy, autofagie, oxidativního stresu a RhoA/Rho kinázové signální dráhy.

### 5.1.1 mTOR/AKT dráha

mTOR (mammalian target of rapamycin) je serin/threonin kináza a centrální regulátor buněčné funkce, který určuje životaschopnost buněk (Völkers et al., 2013). Dysregulace jeho signalizace při srdečních chorobách přispívá k apoptóze kardiomyocytů spojené s mnoha dalšími myokardiálními poškozeními, jež vedou ke zhoršení srdeční funkce. mTOR existuje ve dvou izoformách. mTOR komplex 1 je inhibován pomocí antibiotika rapamycinu, což mimo jiné může vést ke snížení velikosti infarktu myokardu (Khan et al., 2006). Intracelulární podání rapamycinu u myši navíc také indukovalo ochranu kardiomyocytů před nekrózou a apoptózou. mTOR komplex 2 reguluje buněčnou homeostázu, stresové odpovědi, energetický metabolismus a autofagii. Následně se také zjistilo, že RIC, který chrání myokard před ischemií, je spojen s downregulací mTOR (Rohaila et al., 2014).

V souvislosti s výše zmíněnou studií byla prokázána zvýšená aktivace mTOR dráhy v důsledku akutní hyperglykemie (Baranyai et al., 2015). Proto se tito autoři domnívají, že upregulace této signalizace by mohla být zodpovědná za ztrátu kardioprotektivního účinku RPerC.

V předcházejících studiích bylo také ukázáno, že při nadbytku glukózy a oxidativním stresu, tedy při srovnatelných podmínkách nastávajících během akutní hyperglykemie, dochází k aktivaci nejen mTOR dráhy, ale současně i kinázy Akt (Wei et al., 2014). Podobně bylo demonstrováno, že aktivace Akt před ischemií výrazně interferuje s protektivními stimuly, jakými jsou ischemický preconditioning (Fullmer et al., 2013) a ischemický postconditioning (Bouhidel et al., 2008). Všechny tyto výsledky byly v souladu s pokusy prováděnými skupinou Baranyai et al. (2015). Autoři proto postulovali, že hyperglykemie inhibovala kardioprotektivní působení RPerC v důsledku aktivace mechanismů, které jsou součástí Akt-mTOR dráhy.

### 5.1.2 Oxidativní stres

ROS a reaktivní formy dusíku (RNS) hrají důležitou roli jak v poškození myokardu, tak i v jeho ochraně. Zvýšená produkce ROS během I/R může vést ke vzniku oxidativního stresu, který patří mezi nejdůležitější mediátory ischemického poškození. Naopak za fyziologických

podmínek je tvorba volných radikálů nízká, způsobená především únikem elektronů z mitochondriálního elektron-transportního řetězce. Nižší koncentrace ROS mohou přispívat k normální buněčné funkci i signální transdukcii, včetně kardioprotektivní signalizace (Velayutham et al., 2011).

Tvorbu ROS i RNS může výrazně ovlivnit také hyperglykemie (Su et al., 2013). Předpokládá se, že vysoká tvorba volných radikálů v průběhu rozvoje cukrovky bude také částečně zodpovědná za větší náchylnost diabetického myokardu k ischemickému poškození a za rozvoj komplikací spojených s diabetem. Produkce ROS je při diabetu spojována především s přerušáním elektron-transportního řetězce, s aktivací NADPH oxidázy a rozpážením (tzv. „uncoupling“) NO syntázy. Naopak hladiny glutathion peroxidázy a dalších enzymatických (superoxid dismutáza, kataláza) i neenzymatických (vitamin E, C, retinol) antioxidantů jsou u diabetických jedinců v porovnání se zdravými poměrně nízké (Ramakrishna & Jailkhani, 2008).

Protektivní stimul, jako RIC, snižuje nitrosativní stres (Albuquerque-Béjar et al., 2015). Jak ukázaly předchozí studie, metabolické komorbidity jsou velmi často spojené se zvýšeným nitrosativním/oxidativním stresem (Li et al., 2013). Podobně i izolovaná srdce perfundovaná hyperglykemickým roztokem vykazovala zvýšenou aktivitu volných radikálů. Ve shodě s těmito poznatky Baranyai et al. (2015) pozorovali u hyperglykemických potkanů *in vivo* zvýšené hladiny markeru nitrosativního stresu (3-nitrotyrosin). U těchto modelů nebyl ochranný vliv RPerC na myokard účinný. Zdá se tedy, že zvýšený oxidativní i nitrosativní stres by pravděpodobně mohl hrát roli v inhibici kardioprotektivního efektu RPerC.

### 5.1.3 Autofagie

Autofagie je životně důležitá katabolická dráha, při které se buňky zbavují poškozených či starých organel. Pohlčený materiál je obalen i s cytoplazmou do váčků a následně degradován a recyklován v lysosomech. Proces autofagie hraje důležitou roli v mnoha aspektech buněčné fyziologie a je stimulován především při nedostatku živin a energie. Ischemií vyvolaná vysoká aktivita autofagie má pro srdce ochrannou funkci (Yan et al., 2005). Odstraněním poškozených mitochondrií produkujících ROS a recyklací molekul, které mohou být dále použity pro opravu buněk, napomáhá zmírnit I/R poškození. Inhibice její funkce se může negativně odrazit ve velikosti infarktu a postischemické obnově srdeční kontraktility (Qian et al., 2009). Vzhledem k tomu, že nedostatek glukózy vedl ke stimulaci autofagie (Matsui et al., 2007), nebylo překvapujícím zjištěním, že během diabetu byla její funkce naopak potlačena (Kobayashi et al., 2012).



Účast autofagie v kardioprotekci zprostředkované RPostC byla potvrzena u zdravých myši zvýšenou hladinou autofagických proteinů a větším počtem autofagozomů během časně fáze reperfuze. Naopak u diabetických modelů nebyl RPostC schopen autofagii aktivovat, což se projevilo v absenci jeho protektivního účinku (Han et al., 2014).

Také během RPerC Baranyai et al. (2015) pozorovali v hyperglykemickém myokardu snížené hodnoty autofagického markeru (poměr LC3-II/LC3-I). Hodnoty ostatních autofagických složek však zůstaly nezměněné. Přesto ale byla pozorována vysoká aktivita mTOR dráhy, jako hlavního regulátoru autofagie. Lze tak tedy uvažovat o tom, že potlačení autofagie během hyperglykemie by mohlo (alespoň z části) vést k zablokování protektivního účinku RPerC.

#### **5.1.4 RhoA/Rho kinázová (ROCK) signální dráha**

RhoA/ROCK dráha se podílí na řadě základních fyziologických funkcí včetně buněčné migrace, adheze, apoptózy i kontrakce buněk hladké svaloviny (Rajagopalan et al., 2010; Shiga et al., 2005). Důležitou roli zastává i v patofyziologických kardiovaskulárních chorobách, které jsou spojené se zánětem a endoteliální dysfunkcí (Kishi et al., 2005; Masumoto et al., 2002).

Rho kináza (ROCK) je serin/threoninová kináza, aktivovaná malým GTP vazebným proteinem RhoA. Během I/R dochází ke zvýšení myokardiální aktivity RhoA, který stimulací ROCK přispívá k většímu poškození srdce v důsledku akutní ischemie (Bao et al., 2004). Zvýšená aktivita RhoA/ROCK dráhy je s velkou pravděpodobností také zahrnuta do signálních dějů vedoucích ke snížené biologické dostupnosti NO. Během ischemie se totiž zvyšuje aktivita enzymu arginázy, která je stimulovaná ROS a zánětlivými cytokiny právě prostřednictvím ROCK signalizace (Chandra et al., 2012; Ming et al., 2004). Jak již bylo probíráno v předešlé kapitole (viz kapitola 4.4.2), v důsledku zvýšených hladin arginázy dochází k posunu metabolismu argininu z eNOS směrem k argináze, která přeměňuje L-arginin na L-ornithin, čímž je snižována produkce NO a dochází k narušení funkce cév a kardiovaskulárním komplikacím. Interakci mezi ROCK a arginázou naznačují výzkumy spojené s farmakologickou inhibicí ROCK, která zároveň výrazně snížila velikost infarktu a vedla k inhibici arginázové aktivity v I/R myokardu (Kiss et al., 2014).

Zvýšené hladiny obou složek, arginázy i ROCK byly pozorovány i během diabetu. Jejich inhibice ochránila diabetické srdce před I/R poškozením, avšak tento protektivní efekt byl u diabetiků blokován inhibitorem endoteliální NO syntázy. To tedy ukazuje, že ROCK inhibice poskytuje diabetickému myokardu ochranu proti I/R poškození prostřednictvím mechanismu,

který zahrnuje snížení aktivity arginázy a zvýšení biologické dostupnosti NO (Tratsiakovich et al., 2017).

RIPerC u zdravých (nediabetických) potkanů potlačil funkci arginázy i Rho kinázy v průběhu akutní I/R. U diabetických modelů však jejich aktivitu neovlivnil (Kiss et al., 2014). Protektivní účinek RIPerC byl navíc zcela zablokován také inhibicí NO syntázy. Proto se zdá být pravděpodobné, že během diabetu dochází k zablokování kardioprotekce zprostředkované RIPerC vlivem zvýšené aktivity ROCK dráhy a následného snížení biologické dostupnosti NO.

## **Závěr**

Remote ischemický preconditioning je efektivní kardioprotektivní strategie, která navozením krátkých, neletálních period ischemie a reperfuze periferních tkání (prováděných během probíhající ischemie myokardu), chrání srdce před I/R poškozením. Díky své jednoduché realizaci může být snadno využita v klinické praxi. Jedná se o neinvazivní metodu, která neprodlužuje operační dobu a lze ji provádět bez speciálních zdravotních zařízení a odborných znalostí, například pomocí inflace a deflace manžety na měření tlaku. Je možné ji využívat prakticky ve všech vybraných i nepředvídatelných situacích, ve kterých existuje nebezpečí I/R poškození srdce. Protektivní vliv RPerC byl potvrzen v mnoha experimentálních studiích, při operacích srdce či transplantacích různých orgánů, přesto však nelze jeho využití v běžné lékařské praxi považovat za samozřejmost. Hlavní problém představují především komorbidita (hypertenze, hyperglykemie aj.) a různé metabolické poruchy. Tato onemocnění mohou způsobit omezení kardioprotektivního působení RPerC. V současnosti je největší výzvou diabetes mellitus, který je v souvislosti s RPerC často zkoumán. Pro objasnění vlivu rizikových faktorů na protektivní účinek RPerC a jeho zavedení do klinické praxe jsou proto nezbytné další studie a výzkumy, které by přinesly lepší pochopení jeho molekulárních mechanismů.

## Seznam literatury

- Albuquerque-Béjar, J. J., Barba, I., Inserte, J., Miró-Casas, E., Ruiz-Meana, M., Poncelas, M., Vilarrosa, Ú., Valls-Lacalle, L., Rodríguez-Sinovas, A., & Garcia-Dorado, D. (2015). Combination therapy with remote ischaemic conditioning and insulin or exenatide enhances infarct size limitation in pigs. *Cardiovascular Research*, 107(2), 246–254.
- Andreadou, I., Bibli, S. I., Mastromanolis, E., Zoga, A., Efentakis, P., Papaioannou, N., Farmakis, D., Kremastinos, D. T., & Iliodromitis, E. K. (2015). Transient carotid ischemia as a remote conditioning stimulus for myocardial protection in anesthetized rabbits: Insights into intracellular signaling. *International Journal of Cardiology*, 184(1), 140–151.
- Bao, W., Hu, E., Tao, L., Boyce, R., Mirabile, R., Thudium, D. T., Ma, X. L., Willette, R. N., & Yue, T. L. (2004). Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 61(3), 548–558.
- Baranyai, T., Nagy, C. T., Koncsos, G., Onódi, Z., Károlyi-Szabó, M., Makkos, A., Varga, Z. V., Ferdinandy, P., & Giricz, Z. (2015). Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Cardiovascular Diabetology*, 14(1), 1–10.
- Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G., & Schulz, R. (2010). Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Research in Cardiology*, 105(6), 771–785.
- Bøtker, H. E., Kharbanda, R., Schmidt, M. R., Böttcher, M., Kaltoft, A. K., Terkelsen, C. J., Munk, K., Andersen, N. H., Hansen, T. M., Trautner, S., Lassen, J. F., Christiansen, E. H., Krusell, L. R., Kristensen, S. D., Thuesen, L., Nielsen, S. S., Rehling, M., Sørensen, H. T., Redington, A. N., & Nielsen, T. T. (2010). Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *The Lancet*, 375(9716), 727–734.
- Bouhidel, O., Pons, S., Souktani, R., Zini, R., Berdeaux, A., & Ghaleh, B. (2008). Myocardial ischemic postconditioning against ischemia-reperfusion is impaired in ob/ob mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 295(4), 1580–1587.
- Capano, M., & Crompton, M. (2006). Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: Involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases. *Biochemical Journal*, 395(1), 57–64.
- Chandra, S., Romero, M. J., Shatanawi, A., Alkilany, A. M., Caldwell, R. B., & Caldwell, R. W. (2012). Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *British Journal of Pharmacology*, 165(2), 506–519.

- Costa, A. D. T., & Garlid, K. D. (2008). Intramitochondrial signaling: Interactions among mitoKATP, PKC $\epsilon$ , ROS, and MPT. In *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* (Vol. 295, Issue 2).
- Costa, A. D. T., Garlid, K. D., West, I. C., Lincoln, T. M., Downey, J. M., Cohen, M. V., & Critz, S. D. (2005). Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circulation Research*, 97(4), 329–336.
- Fryer, R. M., Hsu, A. K., & Gross, G. J. (2001). Mitochondrial KATP channel opening is important during index ischemia and following myocardial reperfusion in ischemic preconditioned rat hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(4), 831–834.
- \*Fujita, A., & Kurachi, Y. (2000). Molecular aspects of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the cardiovascular system and K<sup>+</sup> channel openers. *Pharmacology and Therapeutics*, 85(1), 39–53.
- Fullmer, T. M., Pei, S., Zhu, Y., Sloan, C., Manzanares, R., Henrie, B., Pires, K. M., Cox, J. E., Abel, E. D., & Boudina, S. (2013). Insulin suppresses ischemic preconditioning-mediated cardioprotection through Akt-dependent mechanisms. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 64, 20–29.
- Galindo, C. L., Kasasbeh, E., Murphy, A., Ryzhov, S., Lenihan, S., Ahmad, F. A., Williams, P., Nunnally, A., Adcock, J., Song, Y., Harrell, F. E., Tran, T., Parry, T. J., Iaci, J., Ganguly, A., Feoktistov, I., Stephenson, M. K., Caggiano, A. O., Sawyer, D. B., & Cleator, J. H. (2014). Anti-Remodeling and Anti-Fibrotic Effects of the Neuregulin-1 $\beta$  Glial Growth Factor 2 in a Large Animal Model of Heart Failure. *Journal of the American Heart Association*, 3(5).
- Garcia, S., Henry, T. D., Wang, Y. L., Chavez, I. J., Pedersen, W. R., Lesser, J. R., Shroff, G. R., Moore, L., & Traverse, J. H. (2011). Long-term follow-up of patients undergoing postconditioning during ST-elevation myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 4(1), 92–98.
- Gent, S., Skyschally, A., Kleinbongard, P., & Heusch, G. (2017). Ischemic preconditioning in pigs: A causal role for signal transducer and activator of transcription 3. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 312(3), H478–H484.
- Ginks, W. R., Sybers, H. D., Maroko, P. R., Covell, J. W., Sobel, B. E., & Ross, J. (1972). Coronary Artery Reperfusion. *Journal of Clinical Investigation*, 51(10), 2717–2723.
- Gonon, A. T., Jung, C., Katz, A., Westerblad, H., Shemyakin, A., Sjöquist, P. O., Lundberg, J. O., & Pernow, J. (2012). Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxide production. *PLoS ONE*, 7(7), 1–8.

- Han, Z., Cao, J., Song, D., Tian, L., Chen, K., Wang, Y., Gao, L., Yin, Z., Fan, Y., & Wang, C. (2014). Autophagy is involved in the cardioprotection effect of remote limb ischemic postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in normal mice, but not diabetic mice. *PLoS ONE*, 9(1), 1–11.
- Hattori, R., Maulik, N., Otani, H., Zhu, L., Cordis, G., Engelman, R. M., Siddiqui, M. A. Q., & Das, D. K. (2001). Role of STAT3 in Ischemic Preconditioning. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(11), 1929–1936.
- Hausenloy, D. J., Iliodromitis, E. K., Andreadou, I., Papalois, A., Gritsopoulos, G., Anastasiou-Nana, M., Kremastinos, D. T., & Yellon, D. M. (2012). Investigating the signal transduction pathways underlying remote ischemic conditioning in the porcine heart. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 26(2), 87–93.
- \*Hausenloy, Derek J., Tsang, A., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2005). Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 288(2 57-2), 971–976.
- Hausenloy, Derek J., & Yellon, D. M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 92–100.
- Hausenloy, Derek J., Yellon, D. M., Mani-Babu, S., & Duchon, M. R. (2004). Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 287(2 56-2).
- Hedhli, N., Huang, Q., Kalinowski, A., Palmeri, M., Hu, X., Russell, R. R., & Russell, K. S. (2011). Endothelium-derived neuregulin protects the heart against ischemic injury. *Circulation*, 123(20), 2254–2262.
- Hein, T. W., Zhang, C., Wang, W., Chang, C.-I., Thengchaisri, N., & Kuo, L. (2003). Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide- mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. *The FASEB Journal*, 17(15), 2328–2330.
- \*Heusch, G. (2015). Molecular basis of cardioprotection signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circulation Research*, 116(4), 674–699.
- \*Heusch, G., Boengler, K., & Schulz, R. (2008). Cardioprotection: Nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation*, 118(19), 1915–1919.
- Heusch, G., Musiolik, J., Gedik, N., & Skyschally, A. (2011). Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation Research*, 109(11), 1302–1308.
- Heusch, G., Musiolik, J., Kottenberg, E., Peters, J., Jakob, H., & Thielmann, M. (2012). STAT5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning in humans. *Circulation Research*, 110(1), 111–115.

- Hougaard, K. D., Hjort, N., Zeidler, D., Sørensen, L., Nørgaard, A., Hansen, T. M., Von Weitzel-Mudersbach, P., Simonsen, C. Z., Damgaard, D., Gottrup, H., Svendsen, K., Rasmussen, P. V., Ribe, L. R., Mikkelsen, I. K., Nagenthiraja, K., Cho, T. H., Redington, A. N., Bøtker, H. E., Østergaard, L., ... Andersen, G. (2014). Remote ischemic preconditioning as an adjunct therapy to thrombolysis in patients with acute ischemic stroke: A randomized trial. *Stroke*, 45(1), 159–167.
- Kersten, J. R., Montgomery, M. W., Ghassemi, T., Gross, E. R., Toller, W. G., Pagel, P. S., & Warltier, D. C. (2001). Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial KATP channels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 280(4 49-4), 1744–1750.
- Khan S. A., S., Salloum, F., Das, A., Xi, L., W. Vetovec, G., & C. Kukreja, R. (2006). Rapamycin confers preconditioning-like protection against ischemia-reperfusion injury in isolated mouse heart and cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 41(2), 256–264.
- Kimura, T., Tajiri, K., Sato, A., Sakai, S., Wang, Z., Yoshida, T., Uede, T., Aonuma, K., Ieda, M., Imanaka, K., Kimura, T., & Tajiri, K. (2018). Tenascin-C Accelerates Adverse Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction by Modulating Macrophage Polarization. *Cardiovascular Research*, 115(3), 614–624.
- Kishi, T., Hirooka, Y., Masumoto, A., Ito, K., Kimura, Y., Inokuchi, K., Tagawa, T., Shimokawa, H., Takeshita, A., & Sunagawa, K. (2005). Rho-kinase inhibitor improves increased vascular resistance and impaired vasodilation of the forearm in patients with heart failure. *Circulation*, 111(21), 2741–2747.
- Kiss, A., Tratsiakovich, Y., Gonon, A. T., Fedotovskaya, O., Lanner, J. T., Andersson, D. C., Yang, J., & Pernow, J. (2014). The role of arginase and Rho kinase in cardioprotection from remote ischemic preconditioning in non-diabetic and diabetic rat in vivo. *PLoS ONE*, 9(8).
- Kleinbongard, P., Amanakis, G., Skyschally, A., & Heusch, G. (2018a). Reflection of cardioprotection by remote ischemic preconditioning in attenuated ST-segment elevation during ongoing coronary occlusion in pigs evidence for cardioprotection from ischemic injury. *Circulation Research*, 122(8), 1102–1108.
- Kleinbongard, P., Skyschally, A., Gent, S., Pesch, M., & Heusch, G. (2018b). STAT3 as a common signal of ischemic conditioning: a lesson on “rigor and reproducibility” in preclinical studies on cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*, 113(1), 10–12.
- \*Kleinbongard, P., Skyschally, A., & Heusch, G. (2017). Cardioprotection by remote ischemic conditioning and its signal transduction. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 469(2), 159–181.
- Kobayashi, S., Xu, X., Chen, K., & Liang, Q. (2012). Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy*, 8(4), 577–592.

- Konstantinov, I. E., Arab, S., Kharbanda, R. K., Li, J., Cheung, M. M. H., Cherepanov, V., Downey, G. P., Liu, P. P., Cukerman, E., Coles, J. G., & Redington, A. N. (2005). The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiological Genomics*, *19*, 143–150.
- Lacerda, L., Somers, S., Opie, L. H., & Lecour, S. (2009). Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovascular Research*, *84*(2), 201–208.
- Lecour, S., Suleman, N., Deuchar, G. A., Somers, S., Lacerda, L., Huisamen, B., & Opie, L. H. (2005). Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor- $\alpha$  activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*, *112*(25), 3911–3918.
- \*Lejay, A., Fang, F., John, R., Van, J. A. D., Barr, M., Thaveau, F., Chakfe, N., Geny, B., & Scholey, J. W. (2016). Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *91*, 11–22.
- Li, H., Liu, Z., Wang, J., Wong, G. T., Cheung, C. W., Zhang, L., Chen, C., Xia, Z., & Irwin, M. G. (2013). Susceptibility to myocardial ischemia reperfusion injury at early stage of type 1 diabetes in rats. *Cardiovascular Diabetology*, *12*(1), 1–11.
- Li, J., Bombeck, C. A., Yang, S., Kim, Y. M., & Billiar, T. R. (1999). Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(24), 17325–17333.
- Li, L., Luo, W., Huang, L., Zhang, W., Gao, Y., Jiang, H., Zhang, C., Long, L., & Chen, S. (2010). Remote Perconditioning Reduces Myocardial Injury in Adult Valve Replacement : A Randomized Controlled Trial. *J Surg Res*, *26*.
- Lonborg, J., Vejlsstrup, N., Kelbæk, H., Holmvang, L., Jorgensen, E., Helqvist, S., Saunamäki, K., Ahtarovski, K. A., Botker, H. E., Kim, W. Y., Clemmensen, P., & Engstrom, T. (2013). Final infarct size measured by cardiovascular magnetic resonance in patients with ST elevation myocardial infarction predicts long-term clinical outcome: An observational study. *European Heart Journal Cardiovascular Imaging*, *14*(4), 387–395.
- Loubani, M., & Galiñanes, M. (2002). Pharmacological and ischemic preconditioning of the human myocardium: mitoKATP channels are upstream and p38MAPK is downstream of PKC. *BMC Physiology*, *2*, 1–13.
- Loubani, M., Hassouna, A., & Galiñanes, M. (2004). Delayed preconditioning of the human myocardium: Signal transduction and clinical implications. *Cardiovascular Research*, *61*(3), 600–609.



- Loukogeorgakis, S. P., Williams, R., Panagiotidou, A. T., Kolvekar, S. K., Donald, A., Cole, T. J., Yellon, D. M., Deanfield, J. E., & MacAllister, R. J. (2007). Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a KATP channel-dependent mechanism. *Circulation*, 116(12), 1386–1395.
- Ma, X. I., Weyrich, A. S., Lefer, D. J., & Lefer, A. M. (1993). Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circulation Research*, 72(2), 403–412.
- Maekawa, N., Wada, H., Kanda, T., Niwa, T., Yamada, Y., Saito, K., Fujiwara, H., Sekikawa, K., & Seishima, M. (2002). Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Journal of the American College of Cardiology*, 39(7), 1229–1235.
- Mapanga, R. F., Joseph, D., Symington, B., Garson, K. L., Kimar, C., Kelly-Laubscher, R., & Essop, M. F. (2014). Detrimental effects of acute hyperglycaemia on the rat heart. *Acta Physiologica*, 210(3), 546–564.
- Maroko, P. R., Libby, P., Ginks, W. R., Bloor, C. M., Shell, W. E., Sobel, B. E., & Ross, J. (1972). Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 51(10), 2710–2716.
- Masumoto, A., Mohri, M., Shimokawa, H., Urakami, L., Usui, M., & Takeshita, A. (2002). Suppression of coronary artery spasm by the Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina. *Circulation*, 105(13), 1545–1547.
- Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B., & Sadoshima, J. (2007). Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: Roles of AMP-activated protein kinase and beclin 1 in mediating autophagy. *Circulation Research*, 100(6), 914–922.
- Maulik, N., Engelman, R. M., Rousou, J. A., Flack, J. E., Deaton, D., & Das, D. K. (1999). Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation*, 100(19 SUPPL.).
- McCall, T. B., Boughton-Smith, N. K., Palmer, R. M. J., Whittle, B. J. R., & Moncada, S. (1989). Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochemical Journal*, 261(1), 293–296.
- Ming, X. F., Barandier, C., Viswambharan, H., Kwak, B. R., Mach, F., Mazzolai, L., Hayoz, D., Ruffieux, J., Rusconi, S., Montani, J. P., & Yang, Z. (2004). Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: Implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation*, 110(24), 3708–3714.
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124–1136.

- Negoro, S., Kunisada, K., Tone, E., Funamoto, M., Oh, H., Kishimoto, T., & Yamauchi-Takahara, K. (2000). Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 47(4), 797–805.
- Pastorino, J. G., Chen, S. T., Tafani, M., Snyder, J. W., & Farber, J. L. (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7770–7775.
- Pilz, P. M., Hamza, O., Gidlöf, O., Gonçalves, I. F., Tretter, E. V., Trojanek, S., Abraham, D., Heber, S., Haller, P. M., Podesser, B. K., & Kiss, A. (2019). Remote ischemic preconditioning attenuates adverse cardiac remodeling and preserves left ventricular function in a rat model of reperfused myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 285, 72–79.
- Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R. A., & Whittaker, P. (1993). Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 87(3), 893–899.
- Qian, J., Ren, X., Wang, X., Zhang, P., Jones, W. K., Molkentin, J. D., Fan, G. C., & Kranias, E. G. (2009). Blockade of Hsp20 phosphorylation exacerbates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressed autophagy and increased cell death. *Circulation Research*, 105(12), 1223–1231.
- Rajagopalan, L. E., Davies, M. S., Kahn, L. E., Kornmeier, C. M., Shimada, H., Steiner, T. A., Zweifel, B. S., Wendling, J. M., Payne, M. A., Loeffler, R. F., Case, B. L., Norton, M. B., Parikh, M. D., Nemirovskiy, O. V., Mourey, R. J., Masferrer, J. L., Misko, T. P., & Kolodziej, S. A. (2010). Biochemical, cellular, and anti-inflammatory properties of a potent, selective, orally bioavailable benzamide inhibitor of rho kinase activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(3), 707–716.
- Ramakrishna, V., & Jaiikhani, R. (2008). Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetologica*, 45(1), 41–46.
- Raphael, J., Gozal, Y., Navot, N., & Zuo, Z. (2010). Hyperglycemia inhibits anesthetic-induced postconditioning in the rabbit heart via modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and endothelial nitric oxide synthase signaling. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 55(4), 348–357.
- Rohailla, S., Clarizia, N., Sourour, M., Sourour, W., Gelber, N., Wei, C., Li, J., & Redington, A. N. (2014). Acute, delayed and chronic remote ischemic conditioning is associated with downregulation of mTOR and enhanced autophagy signaling. *PLoS ONE*, 9(10).
- Romero, M. J., Platt, D. H., Tawfik, H. E., Labazi, M., El-Remessy, A. B., Bartoli, M., Caldwell, R. B., & Caldwell, R. W. (2008). Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circulation Research*, 102(1), 95–102.

- \*Rossello, X., & Yellon, D. M. (2018). The RISK pathway and beyond. *Basic Research in Cardiology*, 113(1), 1–5.
- \*Rosenberg, J. H., Werner, J. H., Moulton, M. J., & Agrawal, D. K. (2018). Current Modalities and Mechanisms Underlying Cardioprotection by Ischemic Conditioning. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 11(4), 292–307.
- Samavati, L., Monick, M. M., Sanlioglu, S., Buettner, G. R., Oberley, L. W., & Hunninghake, G. W. (2002). Mitochondrial KATP channel openers activate the ERK kinase by an oxidant-dependent mechanism. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 283(1 52-1), 273–281.
- Sasaki, N., Sato, T., Ohler, A., O'Rourke, B., & Marbán, E. (2000). Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation*, 101(4), 439–445.
- Sato, T., O'Rourke, B., & Marbán, E. (1998). Modulation of mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channels by protein kinase C. *Circulation Research*, 83(1), 110–114.
- Schmidt, M. R., Smerup, M., Konstantinov, I. E., Shimizu, M., Li, J., Cheung, M., White, P. A., Kristiansen, S. B., Sorensen, K., Dzavik, V., Redington, A. N., & Kharbanda, R. K. (2007). Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: First demonstration of remote ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 292(4), 1883–1890.
- Schulman, D., Latchman, D. S., & Yellon, D. M. (2002). Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 283(4 52-4), 1481–1488.
- Shiga, N., Hirano, K., Hirano, M., Nishimura, J., Nawata, H., & Kanaide, H. (2005). Long-term inhibition of RhoA attenuates vascular contractility by enhancing endothelial NO production in an intact rabbit mesenteric artery. *Circulation Research*, 96(9), 1014–1021.
- Shimizu, M., Saxena, P., Konstantinov, I. E., Cherepanov, V., Cheung, M. M. H., Wearden, P., Zhangdong, H., Schmidt, M., Downey, G. P., & Redington, A. N. (2010). Remote Ischemic Preconditioning Decreases Adhesion and Selectively Modifies Functional Responses of Human Neutrophils. *Journal of Surgical Research*, 158(1), 155–161.
- Skyschally, A., Kleinbongard, P., Lieder, H., Gedik, N., Stoian, L., Amanakis, G., Elbers, E., & Heusch, G. (2018). Humoral transfer and intramyocardial signal transduction of protection by remote ischemic preconditioning in pigs, rats, and mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 315(1), H159–H172.
- Smith, R. M., Suleman, N., McCarthy, J., & Sack, M. N. (2002). Classic ischemic but not pharmacologic preconditioning is abrogated following genetic ablation of the TNF $\alpha$  gene. *Cardiovascular Research*, 55(3), 553–560.

- Souza Filho, M. V. P., Loiola, R. T., Rocha, E. L., Simão, A. F. L., Gomes, A. S., Souza, M. H. L. P., & Ribeiro, R. A. (2009). Hind limb ischemic preconditioning induces an anti-inflammatory response by remote organs in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(10), 921–929.
- Su, H., Ji, L., Xing, W., Zhang, W., Zhou, H., Qian, X., Wang, X., Gao, F., Sun, X., & Zhang, H. (2013). Acute hyperglycaemia enhances oxidative stress and aggravates myocardial ischaemia/reperfusion injury: Role of thioredoxin-interacting protein. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 181–191.
- \*Szijártó, A., Czigány, Z., Turóczy, Z., & Harsányi, L. (2012). Remote ischemic preconditioning - A simple, low-risk method to decrease ischemic reperfusion injury: Models, protocols and mechanistic background. A review. *Journal of Surgical Research*, 178(2), 797–806.
- Tamarelle, S., Mateus, V., Ghaboura, N., Jeanneteau, J., Croué, A., Henrion, D., Furber, A., & Prunier, F. (2011). RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Research in Cardiology*, 106(6), 1329–1339.
- Teoh, L. K. K., Grant, R., Hulf, J. A., Pugsley, W. B., & Yellon, D. M. (2002). The effect of preconditioning (ischemic and pharmacological) on myocardial necrosis following coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovascular Research*, 53(1), 175–180.
- Tratsiakovich, Y., Kiss, A., Gonon, A. T., Yang, J., Sjöquist, P. O., & Pernow, J. (2017). Inhibition of Rho kinase protects from ischaemia-reperfusion injury via regulation of arginase activity and nitric oxide synthase in type 1 diabetes. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 14(3), 236–245.
- Tratsiakovich, Y., Thomas Gonon, A., Krook, A., Yang, J., Shemyakin, A., Sjöquist, P. O., & Pernow, J. (2013). Arginase inhibition reduces infarct size via nitric oxide, protein kinase C epsilon and mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channels. *European Journal of Pharmacology*, 712(1–3), 16–21.
- Tsang, A., Hausenloy, D. J., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2004). Postconditioning: A form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circulation Research*, 95(3), 230–232.
- Velayutham, M., Hemann, C., & Zweier, J. L. (2011). Removal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and generation of superoxide radical: Role of cytochrome c and NADH. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(1), 160–170.
- Völkers, M., Konstandin, M. H., Doroudgar, S., Toko, H., Quijada, P., Din, S., Joyo, A., Ornelas, L., Samse, K., Thuerauf, D. J., Gude, N., Glembotski, C. C., & Sussman, M. A. (2013). Mechanistic target of rapamycin complex 2 protects the heart from ischemic damage. *Circulation*, 128(19), 2132–2144.

- Wang, S. Y., Cui, X. L., Xue, F. S., Duan, R., Li, R. P., Liu, G. P., Yang, G. Z., & Sun, C. (2016). Combined morphine and limb remote ischemic preconditioning provides an enhanced protection against myocardial ischemia/reperfusion injury by antiapoptosis. *Journal of Surgical Research*, 202(1), 13–25.
- Wegrzyn, J., Potla, R., Chwae, Y. J., Sepuri, N. B. V., Zhang, Q., Koeck, T., Derecka, M., Szczepanek, K., Szelag, M., Gornicka, A., Moh, A., Moghaddas, S., Chen, Q., Bobbili, S., Cichy, J., Dulak, J., Baker, D. P., Wolfman, A., Stuehr, D., ... Lerner, A. C. (2009). Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science*, 323(5915), 793–797.
- Wei, W. Bin, Hu, X., Zhuang, X. D., Liao, L. Z., & Li, W. D. (2014). GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, likely protects against high glucose-induced cytotoxicity by activation of the AMPK/mTOR signal pathway in H9c2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 389(1–2), 249–256.
- Wei, M., Xin, P., Li, S., Tao, J., Li, Y., Li, J., Liu, M., Li, J., Zhu, W., & Redington, A. N. (2011). Repeated remote ischemic preconditioning protects against adverse left ventricular remodeling and improves survival in a rat model of myocardial infarction. *Circulation Research*, 108(10), 1220–1225.
- White, A. R., Ryoo, S., Li, D., Champion, H. C., Stepan, J., Wang, D., Nyhan, D., Shoukas, A. A., Hare, J. M., & Berkowitz, D. E. (2006). Knockdown of arginase I restores NO signaling in the vasculature of old rats. *Hypertension*, 47(2), 245–251.
- Xin, P., Zhu, W., Li, J., Ma, S., Wang, L., Liu, M., Li, J., Wei, M., & Redington, A. N. (2010). Combined local ischemic preconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 298(6), 1819–1831.
- Yan, L., Vatner, D. E., Kim, S. J., Ge, H., Masurekar, M., Massover, W. H., Yang, G., Matsui, Y., Sadoshima, J., & Vatner, S. F. (2005). Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13807–13812.
- Zarbock, A., Schmidt, C., Van Aken, H., Wempe, C., Martens, S., Zahn, P. K., Wolf, B., Goebel, U., Schwer, C. I., Rosenberger, P., Haeblerle, H., Görlich, D., Kellum, J. A., & Meersch, M. (2015). Effect of remote ischemic preconditioning on kidney injury among high-risk patients undergoing cardiac surgery: A randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 313(21), 2133–2141.
- Zhang, L., Guo, H., Yuan, F., Hong, Z. C., Tian, Y. M., Zhang, X. J., & Zhang, Y. (2018). Limb remote ischemia pre-conditioning protects the heart against ischemia–reperfusion injury through the opioid system in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(1), 68–75.

Zhao, J., Yang, Y., Pei, W., Sun, Y., You, S., & Gao, R. (2009). Remote periconditioning reduces myocardial no-reflow by the activation of K ATP channel via inhibition of Rho-kinase ☆. *International Journal of Cardiology*, 133(2), 179–184.

Zhao, Z. Q., Corvera, J. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., Wang, N. P., Guyton, R. A., & Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 285(2 54-2), 579–588.

Zhu, S. B., Liu, Y., Zhu, Y., Yin, G. L., Wang, R. P., Zhang, Y., Zhu, J., & Jiang, W. (2013). Remote preconditioning, perconditioning, and postconditioning: A comparative study of their cardioprotective properties in rat models. *Clinics*, 68(2), 263–268.

### **Elektronické zdroje:**

*Cardiovascular diseases* [online]. WHO, © 2021 [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: [https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1)

*Ischemická choroba srdeční - ICHS* [online]. IKEM, © 2015 [cit. 29.03.2021]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/ischemicka-choroba-srdecni-ichs/a-420/>